(19)日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11)国際公開番号
WO2006/046661

発行日 平成20年5月22日 (2008.5.22)
(43)国際公開日 平成18年5月4日(2006.5.4)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/46	(2006.01)	C07K 16/46		4B064
C07K 16/28	(2006.01)	C07K 16/28		4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N 5/00	B	4C084
C12P 21/08	(2006.01)	C12P 21/08		4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2006-543262 (P2006-543262)
(21)国際出願番号 PCT/JP2005/019820
(22)国際出願日 平成17年10月27日 (2005.10.27)
(31)優先権主張番号 60/623,018
(32)優先日 平成16年10月28日 (2004.10.28)
(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 504176911
国立大学法人大阪大学
大阪府吹田市山田丘1番1号
(71)出願人 594067748
ユーエイビー リサーチ ファウンデーション
UAB RESEARCH FOUNDATION
アメリカ合衆国 35294－0111
アラバマ州 バーミンガム 20ストリート サウス 701
(71)出願人 000003311
中外製薬株式会社
東京都北区浮間5丁目5番1号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】インターロイキン－6阻害剤

(57)【要約】
本発明により、scFvとFcを含む改変抗体が提供された。本発明の改変抗体は、L鎖とH鎖の可変領域がscFvとして1本鎖として発現される。本発明の改変抗体は、更にFc領域を含む1本鎖のポリペプチドとして発現される。シンプルな構成のベクターで、天然のＩｇＧを模倣した構造を再現することができる。本発明の改変抗体をコードするポリヌクレオチドは、特に、IL-6受容体阻害剤として有用な抗体分子を生体内において発現させるための遺伝子治療用のベクターとして利用することができる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
それぞれ以下に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲが、ヒトイムノグロブリンのフレームワークに組み込まれた抗ＩＬ－６受容体抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含むｓｃＦｖをヒト免疫グロブリンIgG Fc部分に結合した改変抗体。
H鎖V領域のCDR1：SDHAWS（配列番号：３）
H鎖V領域のCDR2：YISYSGITTYNPSLKS（配列番号：４）
H鎖V領域のCDR3：SLARTTAMDY（配列番号：５）
L鎖V領域のCDR1：RASQDISSYLN（配列番号：６）
L鎖V領域のCDR2：YTSRLHS（配列番号：７）　　10
L鎖V領域のCDR3：QQGNTLPYT（配列番号：８）
【請求項２】
H鎖V領域が、アミノ酸配列QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGYSIT SDHAWS WVRQPPGRGLEWIG YIS-YSGITTYNPSLKS RVTMLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR SLARTTAMDY WGQGSLVTVS（配列番号：１）からなる請求項１に記載の改変抗体。
【請求項３】
L鎖V領域が、アミノ酸配列DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDISSYLN WYQQKPGKAPKLLIY YTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC QQGNTLPYT FGQGTKVEIKR（配列番号：２）からなる請求項１に記載の改変抗体。
【請求項４】　　20
前記scFvが、L鎖V領域のC末端においてヒト免疫グロブリンIgG Fc部分に結合した請求項１に記載の改変抗体。
【請求項５】
前記scFvが、N末端からH鎖V領域、リンカー及びL鎖V領域の順に結合された請求項４に記載の改変抗体
【請求項６】
リンカーのアミノ酸配列がGGGGSGGRASGGGGSGGGGS（配列番号：９）である請求項５に記載の改変抗体。
【請求項７】
改変抗体がＳＳ結合によって連結された２量体である請求項１に記載の改変抗体。　　30
【請求項８】
請求項１－７のいずれかに記載の改変抗体と、薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
【請求項９】
請求項１－７のいずれかに記載の改変抗体を、薬学的に許容される担体と配合する工程を含む、医薬組成物の製造方法。
【請求項１０】
それぞれ以下に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲが、ヒトイムノグロブリンのフレームワークに組み込まれた抗ＩＬ－６受容体抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含むｓｃＦｖをヒト免疫グロブリンIgG Fc部分に結合した改変抗体をコードするポリヌクレオチド。　　40
H鎖V領域のCDR1：SDHAWS（配列番号：３）
H鎖V領域のCDR2：YISYSGITTYNPSLKS（配列番号：４）
H鎖V領域のCDR3：SLARTTAMDY（配列番号：５）
L鎖V領域のCDR1：RASQDISSYLN（配列番号：６）
L鎖V領域のCDR2：YTSRLHS（配列番号：７）
L鎖V領域のCDR3：QQGNTLPYT（配列番号：８）
【請求項１１】
H鎖V領域が、アミノ酸配列QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGYSIT SDHAWS WVRQPPGRGLEWIG YIS-YSGITTYNPSLKS RVTMLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR SLARTTAMDY WGQGSLVTVS（配列番号：１）からなる請求項１０に記載のポリヌクレオチド。　　50

【請求項１２】
L鎖V領域が、アミノ酸配列DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDISSYLN WYQQKPGKAPKLLIY YTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC QQGNTLPYT FGQGTKVEIKR（配列番号：２）からなる請求項１０に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１３】
前記scFvが、L鎖V領域のC末端においてヒト免疫グロブリンIgG Fc部分に結合した請求項１０に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１４】
前記scFvが、N末端からH鎖V領域、リンカー及びL鎖V領域の順に結合された請求項１３に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１５】
リンカーのアミノ酸配列がGGGGSGGRASGGGGSGGGGS（配列番号：９）である請求項１４に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１６】
請求項１０－１５のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項１７】
請求項１０－１５のいずれかに記載のポリヌクレオチド、またはそれを含むベクターを発現可能に保持した形質転換体。
【請求項１８】
ヒト細胞由来である請求項１７に記載の形質転換体。
【請求項１９】
請求項１７に記載の形質転換体を培養し、培養物に蓄積された改変抗体を回収する工程を含む、改変抗体の製造方法。
【請求項２０】
請求項１－７のいずれかに記載の改変抗体、請求項１０－１５に記載のいずれかのポリヌクレオチド、請求項１０－１５に記載のいずれかのポリヌクレオチドを発現可能に保持したベクター、および請求項１－７のいずれかに記載の改変抗体を産生する細胞からなる群から選択されたいずれかの成分を有効成分として含有する、インターロイキン６受容体阻害剤。
【請求項２１】
請求項１－７のいずれかに記載の改変抗体、請求項１０－１５に記載のいずれかのポリヌクレオチド、請求項１０－１５に記載のいずれかのポリヌクレオチドを発現可能に保持したベクター、および請求項１－７のいずれかに記載の改変抗体を産生する細胞からなる群から選択されたいずれかの成分を投与する工程を含む、インターロイキン６受容体の阻害方法。
【請求項２２】
請求項１０－１５に記載のいずれかのポリヌクレオチドをヒト細胞中で発現可能に保持した遺伝子治療用ベクター。
【請求項２３】
次の工程を含む、インターロイキン６の作用に起因する疾患の治療方法。
(1) 請求項１０－１５に記載のいずれかのポリヌクレオチドをヒト細胞中で発現可能に保持したベクターを細胞に導入する工程、および
(2) 前記ベクターを導入された細胞を患者に投与する工程
【請求項２４】
細胞が、治療すべき患者から採取された細胞である請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
細胞が末梢血リンパ球である請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
次の要素を含む、インターロイキン６の作用に起因する疾患の治療用キット。
(1) 請求項１０－１５に記載のいずれかのポリヌクレオチドをヒト細胞中で発現可能
10
20
30
40
50

に保持したベクター
(2) ベクター導入用試薬、および
(3) 末梢血リンパ球の分離用試薬
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、改変された抗体に関する。
【背景技術】
【０００２】
インターロイキン－６(Interleukin-6;IL-6)は、B 細胞刺激因子2 (BSF2)あるいはインターフェロンβ2 とも呼称されたサイトカインである。IL-6は、B リンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され（非特許文献１）、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった（非特許文献２）。IL-6は、T リンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている（非特許文献３）。
【０００３】
IL-6は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80kDのリガンド結合性蛋白質のIL-6受容体である (非特許文献４,非特許文献５)。IL-6受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6受容体としても存在する。
【０００４】
特許文献１には、抗IL-6R抗体の種々の形態、例えばヒト化抗IL-6R抗体、キメラ抗IL-6R抗体、などが記載されている。特許文献２には、抗IL-6R抗体などのIL-6アンタゴニストを活性成分とする慢性関節リウマチ治療剤及び滑膜細胞増殖抑制剤が記載されている。特許文献３には、プラズマサイトーシス、高イムノグロブリン血症、貧血、腎炎、悪液質、リウマチ、キャッスルマン病、メサンギウム増殖性腎炎、などのIL-6の生産に起因する疾患の治療について記載されている。特許文献４には、抗IL-6R抗体を有効成分とする、感作T細胞関与疾患、たとえば多発性硬化症、ブドウ膜炎、慢性甲状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎などの予防・治療剤が記載されている。
【０００５】
特許文献４には、抗IL-6R抗体を有効成分とする、全身性エリテマトーデス治療剤が記載されている。特許文献５には、抗IL-6R抗体を有効成分とするクローン病の治療剤が記載されている。特許文献６には、抗IL-6R抗体を有効成分とする膵炎の治療剤が記載されている。特許文献７には、抗IL-6R抗体を有効成分とする乾癬の治療剤が記載されている。特許文献８には、抗IL-6R抗体を有効成分とする小児慢性関節炎の治療剤が記載されている。

【特許文献１】WO92/19759
【特許文献２】WO96/11020
【特許文献３】WO96/12503
【特許文献４】WO98/42377
【特許文献５】WO99/47170
【特許文献６】WO00/10607
【特許文献７】WO02/34292
【特許文献８】WO02/080969
【非特許文献１】Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76
【非特許文献２】Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78
【非特許文献３】Lotz, M. et al., J. Exp. Med. （1988）167, 1253-1258
【非特許文献４】Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981
【非特許文献５】Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】

【０００６】
　抗IL-6受容体抗体は、関節リウマチ（慢性関節リウマチ）やキャッスルマン病の治療に有効であることが臨床試験で明らかとなった。また、本願発明者らにより、抗IL-6R抗体を有効成分とする胸膜中皮腫などの中皮腫の治療剤について特許出願がなされている(WO2005/037315)。更に、本願発明者らにより、抗IL-6R抗体有効成分とする結節性多発性動脈炎、大動脈炎症候群及び免疫異常に伴う血管炎などの血管炎の治療剤について特許出願がなされている(WO2005/061000)。ここで、一般的に抗体医薬品の治療費は高額であるため、コスト削減の意味から抗IL-6受容体抗体（IL-6阻害剤）を効率的に発現させるベクター開発が非常に重要となる。
【０００７】
　しかしながら、抗体のH鎖とL鎖は二つの別々の遺伝子にコードされているため、そのままの形でウイルスベクター等に組み込んで目的細胞に遺伝子を導入しても、効果的な治療薬の発現分泌は困難と考えられる。
　本発明は、IL-6阻害剤として有用な抗IL-6受容体抗体の効率的な発現を可能とする改変抗体とそれを発現するベクター、ならびにそれらの製造方法と用途の提供を課題とする。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
　本発明者らは、抗IL-6受容体抗体の効率的な発現を可能とするために、抗体の構造の改変を試みた。そして、抗IL-6受容体の阻害作用を有し、かつ効率的に製造することができる構造として、抗ＩＬ－６受容体抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含むｓｃＦｖとヒト免疫グロブリンIgG Fc部分を接合した構造が有用であることを見出し、本発明を完成した。すなわち本発明は、以下の改変抗体、それを発現するベクター、ならびにそれらの製造方法と用途を提供する。
【０００９】
〔１〕それぞれ以下に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲが、ヒトイムノグロブリンのフレームワークに組み込まれた抗ＩＬ－６受容体抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含むｓｃＦｖをヒト免疫グロブリンIgG Fc部分に結合した改変抗体。
　　H鎖V領域のCDR1：SDHAWS（配列番号：３）
　　H鎖V領域のCDR2：YISYSGITTYNPSLKS（配列番号：４）
　　H鎖V領域のCDR3：SLARTTAMDY（配列番号：５）
　　L鎖V領域のCDR1：RASQDISSYLN（配列番号：６）
　　L鎖V領域のCDR2：YTSRLHS（配列番号：７）
　　L鎖V領域のCDR3：QQGNTLPYT（配列番号：８）
〔２〕H鎖V領域が、アミノ酸配列QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGYSIT SDHAWS WVRQPPGRGLEWIG YIS-YSGITTYNPSLKS RVTMLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR SLARTTAMDY WGQGSLVTVS（配列番号：１）からなる〔１〕に記載の改変抗体。
〔３〕L鎖V領域が、アミノ酸配列DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDISSYLN WYQQKPGKAPKLLIY YTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC QQGNTLPYT FGQGTKVEIKR（配列番号：２）からなる〔１〕に記載の改変抗体。
〔４〕前記scFvが、L鎖V領域のC末端においてヒト免疫グロブリンIgG Fc部分に結合した〔１〕に記載の改変抗体。
〔５〕前記scFvが、N末端からH鎖V領域、リンカー及びL鎖V領域の順に結合された〔４〕に記載の改変抗体。
〔６〕リンカーのアミノ酸配列がGGGGSGGRASGGGGSGGGGS（配列番号：９）である〔５〕に記載の改変抗体。
〔７〕改変抗体がＳＳ結合によって連結された２量体である〔１〕に記載の改変抗体。
〔８〕〔１〕－〔７〕のいずれかに記載の改変抗体と、薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。
〔９〕〔１〕－〔７〕のいずれかに記載の改変抗体を、薬学的に許容される担体と配合する工程を含む、医薬組成物の製造方法。

〔１０〕それぞれ以下に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲが、ヒトイムノグロブリンのフレームワークに組み込まれた抗ＩＬ－６受容体抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含むｓｃＦｖをヒト免疫グロブリンIgG Fc部分に結合した改変抗体をコードするポリヌクレオチド。
　H鎖V領域のCDR1：SDHAWS（配列番号：３）
　H鎖V領域のCDR2：YISYSGITTYNPSLKS（配列番号：４）
　H鎖V領域のCDR3：SLARTTAMDY（配列番号：５）
　L鎖V領域のCDR1：RASQDISSYLN（配列番号：６）
　L鎖V領域のCDR2：YTSRLHS（配列番号：７）
　L鎖V領域のCDR3：QQGNTLPYT（配列番号：８）　10
〔１１〕H鎖V領域が、アミノ酸配列QVQLQESGPGLVRPSQTLSLTCTVSGYSIT SDHAWS WVRQPPGRGLEWIG YIS-YSGITTYNPSLKS RVTMLRDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR SLARTTAMDY WGQGSLVTVS（配列番号：１）からなる〔１０〕に記載のポリヌクレオチド。
〔１２〕L鎖V領域が、アミノ酸配列DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDISSYLN WYQQKPGKAPKLLIY YTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC QQGNTLPYT FGQGTKVEIKR（配列番号：２）からなる〔１０〕に記載のポリヌクレオチド。
〔１３〕前記scFvが、L鎖V領域のC末端においてヒト免疫グロブリンIgG Fc部分に結合した〔１０〕に記載のポリヌクレオチド。
〔１４〕前記scFvが、N末端からH鎖V領域、リンカー及びL鎖V領域の順に結合された〔１３〕に記載のポリヌクレオチド。　20
〔１５〕リンカーのアミノ酸配列がGGGGSGGRASGGGGSGGGGS（配列番号：９）である〔１４〕に記載のポリヌクレオチド。
〔１６〕〔１０〕－〔１５〕のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
〔１７〕〔１０〕－〔１５〕のいずれかに記載のポリヌクレオチド、またはそれを含むベクターを発現可能に保持した形質転換体。
〔１８〕ヒト細胞由来である〔１７〕に記載の形質転換体。
〔１９〕〔１７〕に記載の形質転換体を培養し、培養物に蓄積された改変抗体を回収する工程を含む、改変抗体の製造方法。
〔２０〕〔1〕－〔7〕のいずれかに記載の改変抗体、〔１０〕－〔１５〕に記載のいずれかのポリヌクレオチド、〔１０〕－〔１５〕に記載のいずれかのポリヌクレオチドを発現可能に保持したベクター、および〔1〕－〔7〕のいずれかに記載の改変抗体を産生する細胞からなる群から選択されたいずれかの成分を有効成分として含有する、インターロイキン６受容体阻害剤。　30
〔２１〕〔1〕－〔7〕のいずれかに記載の改変抗体、〔１０〕－〔１５〕に記載のいずれかのポリヌクレオチド、〔１０〕－〔１５〕に記載のいずれかのポリヌクレオチドを発現可能に保持したベクター、および〔1〕－〔7〕のいずれかに記載の改変抗体を産生する細胞からなる群から選択されたいずれかの成分を投与する工程を含む、インターロイキン６受容体の阻害方法。
〔２２〕〔１０〕－〔１５〕に記載のいずれかのポリヌクレオチドをヒト細胞中で発現可能に保持した遺伝子治療用ベクター。　40
〔２３〕次の工程を含む、インターロイキン６の作用に起因する疾患の治療方法。
　(1) 〔１０〕－〔１５〕に記載のいずれかのポリヌクレオチドをヒト細胞中で発現可能に保持したベクターを細胞に導入する工程、および
　(2) 前記ベクターを導入された細胞を患者に投与する工程
〔２４〕細胞が、治療すべき患者から採取された細胞である〔２３〕に記載の方法。
〔２５〕細胞が末梢血リンパ球である〔２４〕に記載の方法。
〔２６〕次の要素を含む、インターロイキン６の作用に起因する疾患の治療用キット。
　(1) 〔１０〕－〔１５〕に記載のいずれかのポリヌクレオチドをヒト細胞中で発現可能に保持したベクター
　(2) ベクター導入用試薬、および　50

(3) 末梢血リンパ球の分離用試薬

【図面の簡単な説明】

【００１０】

【図１】SV40 late poly A signal を組み込んだ、pShuttle プラスミド を示す図である。

【図２】ヒト免疫グロブリンIgG1のpBluescript IIのBamHI 部位へのサブクローンを示す図である。

【図３】IL-6阻害剤（改変抗体）発現シャトルベクターを示す図である。

【図４】ヒト化抗-IL-6受容体抗体に由来する、IL-6シグナルブロッカーの候補を示す図である。

【図５】ヒト化抗-IL-6受容体抗体との比較による、本発明の改変抗体の親和性を示すグラフである。横軸は反応させた本発明の改変抗体、ヒト化抗-IL-6受容体抗体、コントロール IgGの濃度を示す。

【図６】本発明の改変抗体による、IL-6の受容体結合阻害能を示すグラフである。横軸は反応させた本発明の改変抗体、ヒト化抗-IL-6受容体抗体の濃度を示す。

【図７】本発明の改変抗体による、KT-3細胞の増殖抑制効果を示すグラフである。横軸は反応させた本発明の改変抗体、ヒト化抗-IL-6受容体抗体、コントロール IgGの濃度を示す。

【図８】本発明の改変抗体による、悪性胸膜中皮種におけるIL-6、及びsIL-6R刺激によるVEGFの産生増強作用の抑制効果を示すグラフである。縦軸はVEGFの濃度を示す。

【図９】コンストラクトを構成する各elementsの配置と、elementsの間を連結している塩基配列を示す図である。

【図１０】配列番号：１０、及び配列番号：１０によってコードされるscFvのアミノ酸配列（配列番号：１１）を示す図である。斜体はリンカー部分を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１１】

本発明は、抗IL-6受容体抗体をアデノウイルスベクター等による遺伝子導入に適する単一遺伝子にコードされた蛋白に改変し、遺伝子治療に適したIL-6阻害剤を提供することを課題とする。また、本発明は、抗体のH鎖およびL鎖を同量で発現することにより効率的な抗IL-6受容体抗体の産生が可能な、単一遺伝子にコードされた抗IL-6受容体抗体を提供する。すなわち本発明は、それぞれ以下に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲが、ヒトイムノグロブリンのフレームワークに組み込まれた抗ＩＬ－６受容体抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含むｓｃＦｖとヒト免疫グロブリンIgG Fcを含む改変抗体に関する。

H鎖V領域のCDR1：SDHAWS（配列番号：３）

H鎖V領域のCDR2：YISYSGITTYNPSLKS（配列番号：４）

H鎖V領域のCDR3：SLARTTAMDY（配列番号：５）

L鎖V領域のCDR1：RASQDISSYLN（配列番号：６）

L鎖V領域のCDR2：YTSRLHS（配列番号：７）

L鎖V領域のCDR3：QQGNTLPYT（配列番号：８）

【００１２】

本発明の改変抗体は、抗ＩＬ－６受容体抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含むｓｃＦｖをヒト免疫グロブリンIgG Fc部分に結合することによって構築される。scFvは1本鎖抗体(single chain variable fragments)とも呼ばれる。一般に、scFvまたはscFv抗体断片には、抗体のVHおよびVL領域が含まれる。これらの領域は単一のポリペプチド鎖中に存在する (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。一般に、scFvポリペプチドは、更にV_HおよびV_L領域の間にポリペプチドリンカーを含む。scFvは、リンカーによって抗原結合のために必要な構造を形成することができる（scFvの総説については、Pluckthun『The Pharmacology of Monoclonal Antibodies』Vol.113（Rosenburg and Moore ed (Springer Verlag, New York) pp.269-315, 1994）を参照）。

【００１３】

本発明において、scFvを構成するリンカーのアミノ酸配列は、Ｈ鎖とＬ鎖の可変領域を1本鎖に連結したときに、抗体としての結合特性が維持される限り限定されない。このようなリンカーとしては、たとえば(G_4S) (GGRAS)(G_4S)$_2$、あるいは(G_4S)$_3$などが知られている。

【００１４】

scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域の連結順序も、抗体としての結合特性が維持される限り限定されない。具体的には、N末端から順に［H鎖V領域］－［リンカー］－［L鎖V領域］の順に結合されたｓｃＦｖは、本発明のｓｃＦｖとして好ましい。すなわち本発明における好ましい改変抗体は、以下の構造を有する1本鎖のポリペプチドによって構成される。

H_2N-［H鎖V領域］－［リンカー］－［L鎖V領域］－［Ｆｃ］-COOH

【００１５】

本発明において、ＩｇＧのＦｃは、ヒトＩｇＧの由来のＦｃであれば限定されない。すなわちＣγ１～Ｃγ４のいずれのＦｃをも本発明の改変抗体を構成するＦｃとして利用することができる。一般に、ヒトＩｇＧのＦｃ領域は、ＩｇＧのＣ末端側の約３３０アミノ酸で構成される。本発明の改変抗体を構成するＦｃは、改変抗体のＩＬ－６受容体アゴニスト活性を維持できる範囲で、アミノ酸配列の置換、欠失、挿入、あるいは付加を伴うことができる。

【００１６】

たとえば、FcとしてCH3を含むminibodyは、Fc領域の機能を維持できることが知られている（Hu, S. et al. Cancer Res 56: 3055-3061, 1996)。minibodyは、scFvにCH3を連結した構造を有する。すなわち、CH1とCH2を欠き、scFvとCH3のみからなるイムノグロブリン分子は、本発明に含まれる。あるいは、scFvおよびCH3を必須構造とし、更に付加的にCH1、ヒンジ、およびCH2から選択されるいずれかの領域またはその部分配列を含むイムノグロブリンも、本発明における改変抗体に含まれる。

【００１７】

すなわち本発明は、下記の構成要素(1)-(4)を含み、これらの要素がN末端からC末端にかけて配置された１本鎖ポリペプチド、およびそれをコードするポリヌクレオチドを提供する。

(1)［H鎖V領域］

(2)［リンカー］

(3)［L鎖V領域］および

(4)［Ｆｃ］、または［ＣＨ３を構成するアミノ酸配列を含むＦｃの断片］

ここで、H鎖V領域は、それぞれ配列番号：３～配列番号：４のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１～ＣＤＲ３が、ヒトイムノグロブリンのフレームワークに組み込まれた抗ＩＬ－６受容体抗体のH鎖V領域である。またL鎖V領域は、それぞれ配列番号：６～配列番号：８のアミノ酸配列からなるＣＤＲ１～ＣＤＲ３が、ヒトイムノグロブリンのフレームワークに組み込まれた抗ＩＬ－６受容体抗体のL鎖V領域である。

【００１８】

本発明の改変抗体は、ｓｃＦｖとＦｃとを含む。本発明において、ヒトイムノグロブリンに由来する任意のＦｃを利用することができる。好ましいＦｃは、ヒトＩｇＧ由来のＦｃである。より具体的には、たとえばＩｇＧ１のＦｃを本発明の改変抗体を構成するＦｃとして利用することができる。ＦｃをコードするＤＮＡを単離する方法は公知である。あるいは既にクローン化されたＦｃ遺伝子を本発明に利用することもできる。具体的には、特許文献１に記載のヒト化抗ＩＬ－６受容体抗体のH鎖遺伝子のFc 部分、pdCs-Fc-X 発現ベクター(Protein Engineering vol.11.pp495-500, 1998)、Fc融合型可溶性蛋白遺伝子(Cancer Res. Vol 60: 2167-2177, 2000)などを、本発明におけるFc遺伝子として利用することができる。

【００１９】

本発明の改変抗体は、２分子の1本鎖のポリペプチドがSS結合によって結合されたホモ

２量体であることが望ましい。天然のイムノグロブリンは、通常、Ｈ鎖とＬ鎖の間がＳＳ結合によって架橋されたヘテロダイマーを構成単位とする。このヘテロダイマーが、上記の本発明の改変抗体を構成する１本鎖ポリペプチドに相当する。ＩｇＧは、この構成単位を２つ持つ。ヘテロダイマーの間もまた、ＳＳ結合によって架橋されている。したがって、本発明の改変抗体においても、その構成単位である1本鎖のポリペプチドどうしをＳＳ結合によって架橋してダイマー化することによって、天然のＩｇＧの構造を模倣することができる。

【００２０】

本発明において、ダイマー化のためのＳＳ結合は、１本鎖ポリペプチドの任意のシステイン（Ｃ）を架橋することによって構成することができる。架橋のための好ましいＣは、ヒンジ部分に位置するＣである。より具体的には、ＣＨ１とＣＨ２の間に位置するＣの間をＳＳ結合によって架橋されたホモダイマーは、本発明の改変抗体として好ましい。ポリペプチドは、酸化的条件に置くことで、ＳＳ結合によって架橋することができる。あるいはヒンジを欠く改変抗体の場合には、ＣＨ３の間の疎水的相互作用(hydrophobic interaction)によってダイマー化することもできる。

【００２１】

なお天然のＩｇＧにおいては、ヘテロダイマーを構成するためにヒンジ領域に存在するシステイン（Ｃ）が利用されている。しかし本発明においては、可変領域は１本鎖のscFvで構成され、ＶＬの結合のためのシステイン（Ｃ）を必要としない。したがって、ヒンジに位置するシステイン（Ｃ）は、他のアミノ酸に置換することができる。たとえば実施例においては、ヒンジ領域のシステイン（Ｃ）が、セリン（Ｓ）に置換されている。

【００２２】

本発明においてscFvを構成する抗ＩＬ－６受容体抗体の可変領域は、ＩＬ－６受容体に対するマウスモノクローナル抗体（ＰＭ－１）の重鎖（H鎖）及び軽鎖（L鎖）を構成する可変領域（V領域）中の相補性決定領域（CDR）を、ヒト抗体V領域の対応するCDR領域と置き換えた構造を有する。前記マウス抗ＩＬ－６受容体抗体のL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列は、特許文献１の表２のV_LPM-1の行のCDR1、CDR2及びCDR3に記載されている。また、前記マウス抗ＩＬ－６受容体抗体のH鎖V領域のCDRのアミノ酸配列は、特許文献１の表３のV_HPM-1の行のCDR1、CDR2及びCDR3に記載されている。

【００２３】

一般に、抗体の抗原に対する結合特性は相補性決定領域(complementarity-determining region; CDR)によって決定される。そのため、上記CDRを任意のフレームワークに移植することによって、前記マウスモノクローナル抗体PM-1の抗原結合特性を再構成することができる。たとえば、マウスのイムノグロブリン由来のCDRを、ヒトイムノグロブリンのフレームワークに移植することができる。このようなストラテジーに基づいて再構成されたイムノグロブリンは、再構成(reshaped)ヒト抗体と呼ばれる。

【００２４】

E.A.Kabatら（（1987）Sequences of Proteins of Immunological Interest,Forth Edition, U.S.Department of Health and Human Services,U.S.Government Printing Office）により定義される、ヒトＶ領域の異なるサブグループについてのコンセンサス配列との比較によって、イムノグロブリンの可変領域を構成するアミノ酸配列の中から、CDRおよびFRに相当する領域を特定することができる。

【００２５】

再構成(reshaped)ヒト抗体は、ヒト化抗体(humanized antibody)とも称される改変抗体である。再構成(reshaped)ヒト抗体は、免疫動物由来の抗体のCDRを、ヒトイムノグロブリンのCDRへ移植することによって構築される。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。

【００２６】

具体的には、マウス抗体のCDRをコードする塩基配列を含み、かつその3’末端においてヒト抗体のフレームワーク領域（framework region；FR）に相補的な塩基配列を含むプラ

イマーを利用して、CDRを置換することができる。マウスの各CDRのそれぞれについて、ヒトFRの塩基配列を連結した合成プライマーが、隣接するFRにアニールするプライマーと組み合わせてPCR法に用いられる。このようなプライマーセットで、ヒト可変領域遺伝子を鋳型としてPCR法を行うと、CDRとしてマウスの塩基配列を有し、ヒト由来のFRの塩基配列が連結されたDNAが増幅される。各CDRの増幅産物の末端部分がオーバーラップするようにデザインされる。最終的に３つのCDRを含む各増幅産物の全てを混合してPCRを行う。各増幅産物のオーバーラップした部分は、互いにアニールしてプライマーとして機能する。その結果、CDRがマウス由来の塩基配列に置換された可変領域の全長配列を得ることができる。（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、CDRが良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。 10

【００２７】

本発明におけるヒトイムノグロブリンのフレームワークは、限定されない。たとえば前記ヒト化ＩＬ－６受容体抗体のL鎖V領域のフレームワーク領域（FR）は、ヒト抗体REI由来のものが好ましい。ヒト抗体ＲＥＩ由来のＦＲのアミノ酸配列は、特許文献１の表２のREIの行のFR1、FR2、FR3及びFR4に記載されている。

【００２８】

また、前記ヒト化ＩＬ－６受容体抗体のH鎖V領域のフレームワーク領域（FR）は、ヒト抗体NEW由来のものが好ましい。ヒト抗体NEWのＦＲのアミノ酸配列は、特許文献１の表３のNEWの行のFR1、FR2、FR3及びFR4に記載されている。 20

【００２９】

ヒト抗体のFRとマウス抗体のCDRから構成されるヒト化V鎖の内、FR領域は、抗原結合性や中和活性の改善のため、種々改変されていても良い。たとえば、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換できることが知られている（Sato, K.et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。本願で使用するヒト化ＩＬ－６受容体抗体は、Ｌ鎖Ｖ領域については、特許文献１の表２のRV$_L$a（バージョンa）、及び、Ｈ鎖Ｖ領域については、特許文献１の表３のRV$_H$f（バージョンf）が好ましい。以下に、本発明における好ましいヒト化V鎖のアミノ酸配列を示す。配列中、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、およびＣＤＲ３をカッコ内に記載し、下線を付けた。各下線部の両側の小文字で示した位置にＦＲ１～ＦＲ４が位置する。 30

Ｈ鎖Ｖ領域RV$_H$f（配列番号：１）：

qvqlqesgpglvrpsqtlsltctvsgysit [SDHAWS] wvrqppgrglewig [YIS-YSGITTYNPSLKS] rvtmlrdtsknqfslrlssvtaadtavyycar [SLARTTAMDY] wgqgslvtvs

L鎖V領域RV$_L$a(配列番号:2):

diqmtqspsslsasvgdrvtitc [RASQDISSYLN] wyqqkpgkapklliy [YTSRLHS] gvpsrfsgsgsgtdftftisslqpediatyyc [QQGNTLPYT] fgqgtkveikr

【００３０】

更に本発明は、これらの改変抗体をコードするポリヌクレオチドに関する。すなわち本発明は、それぞれ以下に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲが、ヒトイムノグロブリンのフレームワークに組み込まれた抗ＩＬ－６受容体抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域を含むｓｃＦｖをヒト免疫グロブリンIgG Fc部分に結合した改変抗体をコードするポリヌクレオチドを提供する。 40

H鎖V領域のCDR1：SDHAWS（配列番号：３）
H鎖V領域のCDR2：YISYSGITTYNPSLKS（配列番号：４）
H鎖V領域のCDR3：SLARTTAMDY（配列番号：５）
L鎖V領域のCDR1：RASQDISSYLN（配列番号：６）
L鎖V領域のCDR2：YTSRLHS（配列番号：７）
L鎖V領域のCDR3：QQGNTLPYT（配列番号：８）

【００３１】

本発明の改変抗体を構成する好ましい構造については既に述べた。先に述べたような構 50

造を与えるアミノ酸配列に基づいて、それをコードする塩基配列をデザインすることができる。あるいは、本発明のポリヌクレオチドは、抗体産生細胞から取得されたイムノグロブリンをコードする遺伝子を目的に応じて改変することによって構築することもできる。改変のための具体的な方法は先に述べたとおりである。

【００３２】

本発明における好ましいポリヌクレオチドとして、次の構造を有するポリペプチドからなる改変抗体をコードするポリヌクレオチドを示すことができる。

H_2N-［H鎖V領域］－［リンカー］－［L鎖V領域］－［Ｆｃ］-COOH

【００３３】

上記のポリペプチドにおいて、［H鎖V領域］は、たとえば配列番号：１（H鎖可変領域）に記載のアミノ酸配列からなるのが好ましい。また、［L鎖V領域］としては、たとえば配列番号：２に記載のアミノ酸配列を示すことができる。更に、好ましいリンカーのアミノ酸配列としては、配列番号：９のアミノ酸配列を示すことができる。このような構造の1本鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとして、たとえば配列番号：１０に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチドを示すことができる。また配列番号：１０によってコードされるscFvのアミノ酸配列を配列番号：１１に示した。配列番号：１０と配列番号：１１におけるリンカー部分は、それぞれ３５５－４１４位および１１９位－１３８位である。リンカー部分は図 10中に斜体で示した。したがって、配列番号：１１における１位－１１８位、１１９位－１３８位、そして１３９位－２４６位に相当するアミノ酸配列が、それぞれ配列番号：１、配列番号：９、および配列番号：２である。

【００３４】

本発明のポリヌクレオチドは、適当な発現ベクターを利用することによって、改変抗体の発現に利用することができる。ポリヌクレオチドの発現産物を細胞外に分泌させるために、リーダー配列（分泌シグナル）をコードするポリヌクレオチドを付加することもできる。リーダー配列は、通常、［H鎖V領域］のN末端に付加される。たとえば図９に示したヒトIgGκ鎖のリーダー配列をリーダー配列として利用することができる。ベクターには、イムノグロブリンあるいはその改変体を発現することができる任意のベクターを利用することができる。

【００３５】

イムノグロブリンを動物細胞や微生物細胞を宿主として発現することができる種々のベクターが公知である(“Expression of engineered antibodies and antibody fragments in microorganisms.“, Methods Enzymol. 1989;178:476-96.、”Single chain antibody variable regions.”, Trends Biotechnol. 1991 Apr;9(4):132-7.)。公知のベクターの中には、ベクターがリーダー配列を含んでいるものもある。このようなベクターを用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドをベクターのリーダー配列に連結することによって、動物細胞において、目的とする改変抗体を分泌する発現ベクターを構築することができる。イムノグロブリンを発現するための動物細胞としては、たとえばＣＯＳ細胞、ＣＨＯ細胞、あるいは悪性胸膜中皮腫細胞などの腫瘍細胞を用いることができる。

【００３６】

これらの動物細胞における、本発明の改変抗体をコードするポリヌクレオチドの発現のためには、動物細胞での発現のために通常用いられるプロモーターを利用することができる。例えば、ヒト・サイトメガロウィルス前期（human cytomegalovirus immediate early;HCMV）プロモーターを使用するのが好ましい。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターとして、HCMV－VH-HCγ１、HCMV-VL-HCK、HCMV-12h-ｇγ１、HCMV-12κ-ｇκ等であって、pSV2neoに由来するものを示すことができる。

【００３７】

その他に、本発明の改変抗体の動物細胞における発現に利用できるプロモーターとして、ヒト・エロンゲーション・ファクター１α（HEF-１α）プロモーターを示すこともできる。このプロモーターを含有する発現ベクターには、HEF-12h-gγ１及びHEF-12k-gκ、並びにHEF－VH-gγ１及びHEF－VL-gκが含まれる。

【００３８】
　宿主細胞系中での遺伝子増幅のため、発現ベクターはさらにdhfr遺伝子を含有することができる。dhfr遺伝子を含有する発現ベクターは例えばDHFR‐ΔE-PMh-gγ１、DHFR‐ΔE‐RVh-PM1-ｆ等である。
【００３９】
　また本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。あるいはまた本発明は、本発明のポリヌクレオチド、またはそれを含むベクターを発現可能に保持した形質転換体に関する。本発明に基づく形質転換体を培養し、培養物に蓄積する本発明の改変抗体を回収することによって、本発明の改変抗体を製造することができる。あるいは、本発明の形質転換体を患者に投与することもできる。患者への投与を目的とする場合には、形質転換体の宿主細胞はヒト細胞であることが望ましい。より好ましくは、投与される患者自身の細胞であることが望ましい。細胞としては、たとえば末梢血リンパ球を用いることができる。
【００４０】
　マウスモノクローナル抗体ＰＭ－１は、ヒトのＩＬ－６受容体阻害剤として有用であることが既に立証されている。したがって、その抗原結合特性を有する本発明の改変抗体は、ＩＬ－６受容体阻害剤として有効である。ＩＬ－６受容体の阻害剤が種々の疾患の治療効果を有することも公知である。たとえば、以下に示すような疾患は、いずれもＩＬ－６受容体の阻害によって治療効果を期待できる。
慢性関節リウマチ(特許文献２)
プラズマサイトーシス、高イムノグロブリン血症、貧血、腎炎、悪液質、リウマチ、キャッスルマン病、メサンギウム増殖性腎炎(特許文献３)
感作Ｔ細胞関与疾患、たとえば多発性硬化症、ブドウ膜炎、慢性甲状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎(特許文献４)
全身性エリテマトーデス(特許文献４)
クローン病(特許文献５)
膵炎(特許文献６)
乾癬(特許文献７)
小児慢性関節炎(特許文献８)
【００４１】
　したがって本発明の改変抗体は、これらの疾患の治療剤として有用である。本発明の改変抗体は、薬学的に許容される担体と配合することによって医薬組成物とすることができる。あるいは本発明は、これら改変抗体を薬学的に許容される担体と配合する工程を含む医薬組成物の製造に関する。更に本発明は、本発明の改変抗体の、これらの疾患を治療するための医薬組成物の製造における使用に関する。
【００４２】
　更に本発明は、本発明の改変抗体、それをコードするポリヌクレオチド、これらポリヌクレオチドを発現可能に保持したベクター、および本発明の改変抗体を産生する細胞からなる群から選択されたいずれかの成分を有効成分として含有する、インターロイキン６受容体阻害剤を提供する。あるいは本発明は、本発明の改変抗体、それをコードするポリヌクレオチド、これらポリヌクレオチドを発現可能に保持したベクター、および本発明の改変抗体を産生する細胞からなる群から選択されたいずれかの成分を患者に投与する工程を含む、インターロイキン６受容体の阻害方法に関する。
【００４３】
　また本発明は、本発明の改変抗体、それをコードするポリヌクレオチド、これらポリヌクレオチドを発現可能に保持したベクター、および本発明の改変抗体を産生する細胞からなる群から選択されたいずれかの成分のこれらの疾患を治療するための医薬組成物の製造における使用に関する。加えて本発明は、本発明の改変抗体、それをコードするポリヌクレオチド、これらポリヌクレオチドを発現可能に保持したベクター、および本発明の改変抗体を産生する細胞からなる群から選択されたいずれかの成分のこれらの疾患の治療にお

ける使用に関する。
【００４４】
治療または予防目的で使用される本発明の改変抗体を有効成分として含む医薬組成物は、必要に応じて、それらに対して不活性な適当な薬学的に許容される担体、媒体等と混和して製剤化することができる。例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤(アスコルビン酸等)、緩衝剤(リン酸、クエン酸、他の有機酸等)、防腐剤、界面活性剤(PEG、Tween等)、キレート剤(EDTA等)、結合剤等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、マンニトールやソルビトール等の糖アルコールを含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80、HCO-50)等と併用してもよい。
【００４５】
また、必要に応じ本発明の改変抗体をマイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる(“Remington's Pharmaceutical Science 16th edition”, Oslo Ed. (1980)等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明の改変抗体に適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 15: 167-277 (1981); Langer, chem.Tech. 12: 98-105 (1982);米国特許第3,773,919号;欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983);EP第133,988号)。
【００４６】
本発明の医薬組成物の投与量は、剤型の種類、投与方法、患者の年齢や体重、患者の症状、進行の程度等を考慮して、最終的には医師の判断により適宜決定される。一般に大人では、1日当たり、0.1～2000mgを1～数回に分けて経口投与することができる。より好ましくは1～1000mg／日、更により好ましくは50～500mg／日、最も好ましくは100～300mg／日である。これらの投与量は患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。投与期間も、患者の治癒経過等に応じて適宜決定することが好ましい。
【００４７】
本発明に基づいて、前記改変抗体、それをコードするポリヌクレオチド、これらポリヌクレオチドを発現可能に保持したベクター、および本発明の改変抗体を産生する細胞からなる群から選択されたいずれかの成分とう薬学的に許容される担体を含む医薬組成物と、当該医薬組成物が前記疾患の治療に使用されることを記載した指示書を含む、医薬パッケージが提供される。指示書とは、医薬組成物の適用疾患、投与量、投与スケジュール、禁忌、医薬組成物の保存条件、あるいは有効期限などを記載することができる。医薬パッケージとすることによって、本発明に基づく医薬組成物を商業的に流通させることができる。
【００４８】
また、本発明の改変抗体をコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うこともできる。投与方法としては、nakedプラスミドによる直接投与の他、リポソーム等にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、HVJベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか(Adolph『ウイルスゲノム法』, CRC Press, Florid (1996)参照)、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆(WO93/17706等)して投与することができる。しかしながら、生体内において抗体が発現され

、その作用を発揮できる限りいかなる方法により投与してもよい。
【００４９】
好ましくは、適当な非経口経路(静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法(電子銃等による)、添鼻薬等粘膜経路を介する方法等)により十分な量が投与される。ex vivoにおいてリポソームトランスフェクション、粒子衝撃法(米国特許第4,945,050号)、またはウイルス感染を利用して血液細胞及び骨髄由来細胞等に投与して、該細胞を動物に再導入することにより本発明の改変抗体をコードする遺伝子を投与してもよい。
【００５０】
本発明の改変抗体は、特に遺伝子治療に応用した場合に有利である。一般にＩｇＧをはじめとする抗体医薬は、多量体構造を有するために、遺伝子治療への応用が難しいと考えられている。遺伝子治療用ベクターの発現産物を、天然の抗体と同じような多量体構造とすることは、現状では困難なためである。しかし本発明の改変抗体は、1本鎖のポリペプチドとして発現させることができる。そのため、現在試みられているような遺伝子治療のための技術水準においても、抗体としての活性を有する状態で、目的の蛋白質（改変抗体）を発現させることができる。なおＩｇＧの多量体構造を模倣するためには、２量体とすることが望ましい。本発明の改変抗体によれば、２量体はホモダイマーによって構成される。同じ分子間で構成されるホモダイマーは、Ｈ鎖とＬ鎖のような、異なるポリペプチド間の２量体化を遺伝子組み換え体で実現することに比べれば、はるかに容易に再現することができる。
【００５１】
たとえばヘテロダイマーにおいては、ヘテロダイマーを構成する各サブユニットが、それぞれの必要量存在していることが求められる。他方よりも多く発現したサブユニットは、パートナーとなるサブユニットが無ければヘテロダイマーを構成できない。一方、ホモダイマーにおいては、発現したサブユニットはほぼ完全にホモダイマーとすることができる。したがって、発現レベルを高度に制御しない条件下でも、目的とするホモダイマーを効率的に生成することができる。このような理由から、本発明の改変抗体は、遺伝子治療に好適である。
【００５２】
すなわち本発明は、本発明の改変抗体をコードするポリヌクレオチドをヒト細胞中で発現可能に保持した遺伝子治療用ベクターを提供する。本発明の遺伝子治療用ベクターは、前記改変抗体をコードするポリヌクレオチドを保持し、ヒト細胞への導入、あるいは感染によって、ヒト細胞内で改変抗体を発現することができる。
【００５３】
遺伝子治療用ベクターのヒト細胞への導入とは、人為的な形質転換工程によるヒト細胞への遺伝子治療用ベクターの導入を含む。具体的には、リポフェクタミンなどの形質転換用試薬により、ベクターをヒト細胞に導入することができる。あるいは、形質転換用試薬の助けを借りず、自律的にヒト細胞への感染を成立させることができる遺伝子治療用ベクターも知られている。たとえばアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ＨＩＶベクター、ワクシニアウイルスベクター、あるいはセンダイウイルス(HVJ)ベクターなどのウイルスベクターは、ヒト細胞への感染能を有するベクターである。具体的には、たとえば、pAdexlcwなどのアデノウイルスベクター、あるいはpZIPneoなどのレトロウイルスベクターが知られている。ベクターへの本発明の改変抗体をコードするDNAは、一般的な遺伝子操作によってウイルスベクターに組み込むことができる(Molecular Cloning ,5.61-5.63）。
【００５４】
たとえば、以下のような操作によって、本発明に基づく改変抗体を発現するアデノウイルスベクターを構築することができる。現在作製されているアデノウイルスベクターの多くは、serotype 5もしくはserotype 2 型をベースにしている。アデノウイルスのE1 regionは複製増殖に必須の部位であり、ここを目的とする遺伝子と置換することにより非増殖

型アデノウイルスを作製することができる。アデノウイルスベクターはヒト腎臓細胞293などを利用して作製される。目的とするベクターを作製するためには36 Kbにもおよぶlinear DNAを作製する必要がある。この巨大DNA作製法として、直接宿主細胞にシャトルベクターとアデノウイルスバックボーンベクターをトランスフェクトし、細胞内で相同組み換えを起こさせる方法と、バクテリアを用いウイルス産生に必要な巨大DNAを作製する方法がある。後者の例としては、AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene)を挙げることができる。

【００５５】

発現された改変抗体を細胞の外に分泌するために、通常、改変抗体は分泌シグナルを有する。改変抗体をコードする遺伝子の発現を制御するプロモーターには、ヒト細胞内で転写活性を有する任意のプロモーターを利用することができる。tetなどの制御可能なプロモーターを組み合わせれば、テトラサイクリンの投与によって改変抗体の発現レベルを制御することができる。改変抗体の発現レベルを保つために、エンハンサーの利用は好ましい。

【００５６】

本発明の遺伝子治療用ベクターは、任意の方法によってヒトに投与することができる。たとえば、生体外においてベクターを導入した細胞を、患者に投与することができる(ex vivo)。細胞は、患者自身から採取された細胞であることが望ましい。患者から採取された細胞は、生体外において培養して増殖させることもできる。患者から容易に採取することができる細胞として、血液細胞を挙げることができる。たとえば末梢血リンパ球は、遺伝子治療用ベクターを導入するための細胞として好ましい。

【００５７】

あるいは、遺伝子治療用ベクターが生体中においても細胞への感染能を有する場合には、遺伝子治療用ベクターを直接患者に投与することもできる(in vivo)。具体的には、皮下、血中、胸腔内、腹腔内、髄腔内、筋肉内、関節内、経鼻的、あるいは経皮的な投与が可能である。

【００５８】

これらの本発明に基づく遺伝子治療用ベクターによる治療方法に必要な要素は、予め組み合わせてキットとすることができる。すなわち本発明は、次の要素を含む、インターロイキン６の作用に起因する疾患の治療用キットを提供する。

　(1) 本発明の改変抗体をコードするポリヌクレオチドをヒト細胞中で発現可能に保持したベクター

　(2) ベクター導入用試薬、および

　(3) 末梢血リンパ球の分離用試薬

ベクター導入用試薬としては、たとえばリポフェクチンやリポフェクタミン（いずれもInvitrogen社の商品名。登録商標）などを利用することができる。また末梢血リンパ球の分離用試薬としては、リンパ球を同定するためのマーカーを認識する抗体を利用することができる。抗体は蛍光色素や磁性粒子と結合することができる。リンパ球のマーカーとしては、CD34などが公知である。本発明による遺伝子治療用のキットは、更に付加的に指示書を含むことができる。なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【００５９】

＜材料＞

ヒト胚性腎臓293細胞をAmerican Type Culture Collection（Manassas, VA）から購入した。293細胞は、10%ウシ胎児血清（FCS）を含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）で培養した。レンネルトリンパ腫由来T細胞（KT-3）（Shimizu S et al., Blood 1988; 72:1826-1828） は、10%FCSおよび4 ng/mlの 組換えIL-6（Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki, Japan）を補充したRPMI1640培地で維持した。組換え可溶性IL-6R（sIL-6R）は中外製薬株式会社（Chugai Pharmaceutical Co., LTD（Roche Group, Shizuoka, Japan））より

10

20

30

40

50

寄与された。他の補足物質および細胞培養液はMediatech-Cellgro（Kansas City, MO）から購入した。全ての制限酵素はNew England Biolabs（Beverly, MA）から、T4 DNAリガーゼはPromega（Madison, WI）から、Taqポリメラーゼおよび PCR試薬はQIAGEN（Valencia, CA）から購入した。

【００６０】

〔実施例１〕

（図１～３）IL-6阻害剤（改変抗体）の作製

ヒト化IL-6受容体抗体（中外製薬株式会社）の重鎖および軽鎖をコードする別々のcDNAから、VHヌクレオチド配列およびVLヌクレオチド配列をPCRで増幅した。1回目の増幅用PCRプライマーは、通常のFv境界の定義（canonical Fv boundary definition）を用いてデザインした。2回目では、VH遺伝子フラグメントとVL遺伝子フラグメントをオーバーラップ伸長PCR法によって共に連結させ、20個のアミノ酸のリンカー$(G_4S)(GGRAS)(G_4S)_2$をコードするDNAセグメントを導入した。加えて、pOPE101細菌発現ベクターへのクローニングを容易にするために、scFvをコードする最終的なDNAの5’末端および3’末端にNco ＩおよびNot Ｉ制限酵素部位を相応するように導入し、抗IL-6受容体ヒト化抗体のpOPE101/scFvを作製した。

【００６１】

真核生物の発現系においてscFvを産生するために、scFvをコードするDNA配列は、c-Mycタグおよび6個のヒスチジン（pOPE101中に存在する）とともにPCRで増幅して、Sna BIを5’末端にAvr Ｉを3’末端に導入し、さらにpPIC9酵母発現プラスミド（Invitrogen, Carlsbad, CA）にクローニングして、抗IL-6受容体ヒト化抗体のpPIC9/scFvを作製した。Fc/抗IL-6受容体ヒト化抗体コーディングDNAのアセンブリを以下のように行った。ヒト免疫グロブリンγ-1遺伝子のヒンジであるCH2およびCH3ドメイン（Fcすなわちfragment constantと総称される）をヒト化IL-6受容体抗体重鎖のcDNAよりPCRで増幅し、システインからセリンへのアミノ酸置換をヒンジ領域に1箇所導入した。システイン残基は通常、軽鎖とのジスルフィド結合を形成する。

【００６２】

Fc遺伝子フラグメントは、マウスIgκ鎖V-J2-Cシグナルペプチド配列とインフレームになるようにpSecTag2aベクター（Invitrogen）にクローニングした。抗IL-6受容体ヒト化抗体のscFv遺伝子をPCRで増幅し、リーダー/Fcとインフレームになるようにクローニングし、抗IL-6受容体ヒト化抗体のpSecTag/Fc/scFvを作製した。最後に、CMVプロモーターとBGHポリアデニル化シグナルとを含む発現カセット全体をpShuttleプラスミド（Stratagene, La Jola, CA）に再クローニングし、抗IL-6受容体ヒト化抗体のpShuttle/CMV/Fc/scFvを作製した。コンストラクトを構成する各elementsの配置と、elementsの間を連結している塩基配列を図９に示した。

【００６３】

（図１B）pShuttle プラスミド（Stratagene, La Jola, CA）のマルチプルクローニングサイト（multiple cloning site）にpGL3basic Vector (Promega)由来のSV40 late poly A signal を組み込んだ。

（図２A）ヒト免疫グロブリンIgG1のH鎖のヒンジ部位よりC末をpBluescript IIのBamHI 部位にサブクローンした。ヒンジ部のN末に制限酵素SpeI 部位を設けた。

（図２B）上記のプラスミドで、pBluescript IIのKpnI～XhoI 部位にサイトメガロウィルス エンハンサー／プロモーター 領域（CMV）を挿入した。

（図３A）上記のプラスミドよりCMV- マルチプルクローニングサイト（multiple cloning site）-ヒンジ-Fc のフラグメントを切り出し、図１Bのプラスミドの KpnI～XbaI 部位に挿入した。このプラスミドで、EcoRV, SpeI 部位はユニークサイトであり、同部位に他の遺伝子を組み込むことにより、その遺伝子とFc との融合蛋白を作ることが可能である。上記ヒト化抗-IL-6 受容体抗体のpShuttle/CMV/Fc/scFv よりscFv部を切り出し、EcoRV～SpeI 部位 に挿入してIL-6阻害剤（改変抗体）発現シャトルベクターを完成した。

【００６４】

組換えアデノウイルスゲノムを作製するために、AdEasyアデノウイルスベクターシステム（Stratagene）を取扱説明書に従って用いた。IL-6阻害剤発現シャトルベクターを、pAdEasy-1プラスミドとともに大腸菌BJ5183に共トランスフェクトし、相同組換えを達成させた。ウイルスゲノムを細胞から回収し、IL-6阻害剤DNAの存在を制限消化およびインサート特異的なプライマーによるPCRによって確認した。組換えAdウイルスゲノムを293細胞にトランスフェクトし、組換えAd5/IL-6阻害剤をレスキュー（rescue）して大量に産生した後、塩化セシウムで精製した。ウイルス粒子力価の測定は、Maizel et al.の方法により、260nmでの1吸光度単位あたり1.1×10^{12}ウイルス粒子（v.p.）の変換係数を用いて分光高度法で行った。

【００６５】

IL-6阻害剤を大量に産生するために、組換えAd5/IL-6阻害剤を発現システムとして用いた。10個のT75フラスコにおいて、感染効率（MOI）100 v.p./細胞でAd5/IL-6阻害剤を293細胞に感染させた。感染を37℃で1時間実施した後、培地を交換した。感染3日後、培養上清を収集し、等量の冷飽和硫酸アンモニウムを添加してタンパク質を沈殿させた。沈殿物を遠心分離により収集し、もとの培養液量の1/20の量のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解し、さらにPBSに対して透析した。Sigma（St. Louis, MO）から購入したプロテインA抗体精製キット（Protein A Antibody Purification Kit）を製造元の説明書に従って使用してアフィニティークロマトグラフィーを行い、透析後のタンパク質溶液から組換えIL-6阻害剤タンパク質を精製した。タンパク質濃度はBradfordタンパク質アッセイ（Bio-Rad）によりウシγグロブリンを標準として測定した。

【００６６】

（図４）本発明者らはまず、ヒト化抗-IL-6受容体抗体 のH鎖とL鎖を用いsingle chain fragment variant (ヒト化抗-IL-6受容体抗体のscFv)を作製した。このscFvをヒト免疫グロブリンIgG Fc部分と融合させ、二量体を作製しNew receptor inhibitor for IL-6 (本発明の改変抗体)を樹立した。

次に本発明の改変抗体遺伝子を非増殖型アデノウイルスに組み込み、サイトメガロプロモーター下に本発明の改変抗体が発現するベクターを作製した。この本発明の改変抗体発現アデノウイルス(Ad CMV)を種々の人細胞に感染させ、その上清を集め、プロテインAカラムを用い 本発明の改変抗体を精製した。

【００６７】

〔実施例２〕

(図５)　結合アッセイ

本発明の改変抗体のIL-6受容体に対する親和性を検討した。96穴ELISAプレートにまずIL-6受容体を認識するMT-18をコーティングした。MT-18のIL-6受容体認識部位はヒト化抗-IL-6受容体抗体と異なり、ヒト化抗-IL-6受容体抗体と競合することはないことが証明されている。MT-18のコーティング濃度は、5μg/mlの溶液を１well当り100μl入れ一晩静置した。その後トリス緩衝生理食塩水（TBS）で洗浄し、６％ bovine serum albuminでブロッキングを行った。ブロッキング後可溶性IL-6受容体（sIL-6R）を反応させ、ELISAプレートへ固定させた。sIL-6Rの濃度は、100 ng/mlの溶液を１well当り100μl反応させた。その後さまざまな濃度の本発明の改変抗体、ヒト化抗-IL-6受容体抗体、コントロール IgGを反応させた。二次抗体としてHRP conjugated anti-Fc fragment F(ab’)2 (Dako)を使用した。発色にはOPD peroxidase substrate(Sigma)を使用した。図４で、横軸は反応させた本発明の改変抗体、ヒト化抗-IL-6受容体抗体、コントロール IgGの濃度を示す。これから明らかなように、本発明の改変抗体はヒト化抗-IL-6受容体抗体に比べIL-6受容体に対する結合能は勝るとも劣らないものであった。

【００６８】

〔実施例３〕

（図６）　阻害アッセイ

次にIL-6のIL-6受容体への結合を本発明の改変抗体が競合的に阻害できるか検討した。sIL-6RのELISAプレートへの固定は前述の如く行った。10 ng/ml濃度のビオチン化IL-6と

種々の濃度の本発明の改変抗体もしくはヒト化抗-IL-6受容体抗体を競合させた結果、本発明の改変抗体のIL-6の受容体結合阻害能はヒト化抗-IL-6受容体抗体に匹敵するものであった。

【００６９】

（図７）　IL-6依存性増殖を示すリンパ腫KT-3を用い、実際に本発明の改変抗体が細胞生物学的にIL-6刺激をブロックできるか検討した。KT－3の細胞濃度は10,000 cells/wellとし、96well使用した。500 pg/mlのIL-6濃度で培養しているKT-3に対し、種々の濃度の本発明の改変抗体、ヒト化抗-IL-6受容体抗体もしくはコントロール IgGを投与した。５日間培養した後、MTS アッセイを行った。図７に結果を示す。KT-3に対する増殖抑制効果もヒト化抗-IL-6受容体抗体に匹敵した。

【００７０】

（図８）　悪性胸膜中皮腫H2052はIL-6およびsIL-6R刺激により、VEGFの産生増強をきたすことが判明している。このH2052を用いて、本発明の改変抗体がIL-6刺激によるVEGF産生誘導を抑制することができるか検討した。20 well plateで、悪性中皮種細胞H2052を細胞濃度50,000/wellで培養を開始した。一晩静置した後、5nMの本発明の改変抗体、ヒト化抗-IL-6受容体抗体、ヒト IgG、コントロールに培地を交換した。無刺激、およびIL-6(10ng/ml)+sIL-6R(100ng/ml)刺激を開始した。実験はtriplicate(3連)で行った。４８時間培養した後、上清中のVEGFの濃度を測定し、生産量を検討した。図８に結果を示す。この系においても、本発明の改変抗体はオリジナルヒト化抗-IL-6受容体抗体に比べ同等の抑制能を示した。

【産業上の利用可能性】

【００７１】

本発明は、ＩＬ－６阻害剤として有用な改変抗体を提供した。本発明の改変抗体は、１本鎖ポリペプチドとして発現することができる。そのため、本発明の改変抗体は、特に遺伝子治療において有用である。具体的には、本発明の改変抗体をコードするポリヌクレオチドを患者に導入し、患者の生体内で、有効成分である改変抗体を発現させることができる。改変抗体は１本鎖のポリペプチドであるため、生体内で用意に発現させることができ、更に、天然のＩｇＧの構造を模倣したホモダイマーを効率的に生成することができる。実際に本発明に基づいて生成された改変抗体は、たとえば、天然のＩｇＧと同等の抗癌作用を有していることが確認された。

【図５】

(OD)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
0.04
0.2
1.0
(μg/ml)
本発明の改変抗体
ヒト化抗-IL-6受容体抗体
IgG
sIL-6R(-)

【図６】

(OD)
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
50
10
2
0.4
0
(nM)
本発明の改変抗体
ヒト化抗-IL-6受容体抗体

【図７】

KT-3
OD450
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
0.02μg/ml
0.1μg/ml
0.5μg/ml
2.5μg/ml
12.5μg/ml
本発明の改変抗体
ヒト化抗-IL-6受容体抗体
IgG

【図８】

H2052
(pg/ml)
800
600
400
200
0
w/o IL-6/sIL-6R
with IL-6/sIL-6R
本発明の改変抗体
ヒト化抗-IL-6受容体抗体
hIgG
なし

【図９】 【図１０】

【配列表】
2006046661000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/019820

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/28 (2006.01), ***C12N15/00*** (2006.01), ***C12P21/08*** (2006.01), ***A61K39/395*** (2006.01), ***A61P29/00*** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/28 (2006.01), ***C12N15/00*** (2006.01), ***C12P21/08*** (2006.01), ***A61K39/395*** (2006.01), ***A61P29/00*** (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CAplus(STN), SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 92/19759 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 12 November, 1992 (12.11.92), Claims; sequence Nos. 54, 57 & JP 05-227970 A & US 5795965 A1 & EP 628639 A1	1-22,26
Y	WO 2003/072134 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 04 September, 2003 (04.09.03), Claims & EP 1491209 A1 & US 2005/095242 A1	1-22,26
Y	LIU J. et al., "pPIC9-Fc: a vector system for the production of single-chain Fv-Fc fusions in Pichia pastoris as detection reagents in vitro.", J.Biochem. (Tokyo)., 2003, Vol.134, No.6, p.911-7.	1-22,26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 November, 2005 (22.11.05)	06 December, 2005 (06.12.05)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japanese Patent Office	
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/019820

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ONO, K. et al., "Production of anti-prion scFv-Fc fusion proteins by recombinant animal cells.", J.Biosci.Bioeng., 2003, Vol.95, No.3, p.231-8.	1-22,26
Y	WU AM. et al., "Multimerization of a chimeric anti-CD20 single-chain Fv-Fc fusion protein is mediated through variable domain exhange.", Protein Eng., 2001, Vol.14, No.12, p.1025-33.	1-22,26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/019820

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 23-25
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 23-25 relate to a method of treating diseases caused by the action of interleukin-6, so that they pertain to methods for treatment of a human body by surgery or therapy and relevant diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International (continued to extra sheet)

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee..

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/019820

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Searching Authority is not required to search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００５／０１９８２０

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. **C07K16/28** (2006.01), **C12N15/00** (2006.01), **C12P21/08** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P29/00** (2006.01)

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. **C07K16/28** (2006.01), **C12N15/00** (2006.01), **C12P21/08** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P29/00** (2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２００５年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２００５年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２００５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), CAplus(STN), SwissProt/PIR/Geneseq , JSTPlus(JOIS)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	WO 92/19759 A1(中外製薬株式会社)1992.11.12,特許請求の範囲，配列番号５４，配列番号５７ & JP 05-227970 A & US 5795965 A1 & EP 628639 A1	1-22,26
Y	WO 2003/072134 A(協和発酵工業株式会社)2003.09.04,特許請求の範囲 & EP 1491209 A1 & US 2005/095242 A1	1-22,26

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　２２．１１．２００５

国際調査報告の発送日　０６．１２．２００５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　９７３９
田中　晴絵
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（２００５年４月）

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２００５／０１９８２０

C（続き）． 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LIU J, et. al., "pPIC9-Fc: a vector system for the production of single-chain Fv-Fc fusions in Pichia pastoris as detection reagents in vitro.", J Biochem (Tokyo)., 2003, Vol. 134, No. 6, p. 911-7.	1-22, 26
Y	ONO K, et. al., "Production of anti-prion scFv-Fc fusion proteins by recombinant animal cells." J Biosci Bioeng. , 2003, Vol. 95, Np. 3, p. 231-8.	1-22, 26
Y	WU AM, et. al., "Multimerization of a chimeric anti-CD20 single-chain Fv-Fc fusion protein is mediated through variable domain exchange." Protein Eng., 2001, Vol. 14, No. 12, p. 1025-33.	1-22, 26

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００５／０１９８２０

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☑ 請求の範囲　２３－２５　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲２３－２５は、インターロイキン６の作用に起因する疾患の治療方法に関するものであって、手術又は治療による人体の処置方法及び診断方法に該当し、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2．☐ 請求の範囲＿＿＿＿は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲＿＿＿＿は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 39/395	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｍ	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ 48/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 43/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
Ａ６１Ｋ 35/76	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	35/76		
Ａ６１Ｐ 25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ 27/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ 5/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/14		
Ａ６１Ｐ 37/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08		
Ａ６１Ｐ 17/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(72)発明者 カーリエル デイビッド ティー.
アメリカ合衆国 アラバマ州 バーミンガム リンウッド ロード ８２４
(72)発明者 プレボーブ アレキサンダー
アメリカ合衆国 アラバマ州 バーミンガム アパートメント エイ ベスタビア パーク レーン ２０１０
(72)発明者 安達 康雄
大阪府吹田市山田丘１－３ 大阪大学大学院生命機能研究科免疫制御学講座内
(72)発明者 岸本 忠三
大阪府富田林市中野町３－５－３１
(72)発明者 西本 憲弘
大阪府箕面市如意谷４－６－９－８０４

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA44 BA63 CA04 CA06 CA07 CA10 DA02 DA06 EA02
FA15 GA11 HA12 HA17
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA13 NA14 ZA01 ZA33 ZA89 ZB13 ZC06
4C085 AA34 BB36 CC22 EE01
4C087 AA01 BC83 NA14 ZA01 ZA33 ZA89 ZB13 ZC06
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA14 BA15 BA17 BA41 CA40
DA50 DA76 EA22 FA74